



## СОДЕРЖАНИЕ

Реферат .....	3
Введение.....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Рак желудка.....	6
1.1.1 Классификация рака желудка.....	6
1.1.2 Этиология и факторы риска рака желудка.....	7
1.1.3 Патогенез рака желудка .....	10
1.2 Роль нейтрофильных гранулоцитов в развитии рака желудка.....	13
1.2.1 Характеристика нейтрофильных гранулоцитов .....	13
1.2.2 Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов .....	14
1.2.3 Воздействие нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые клетки ....	17
1.2.3.1 Противоопухолевое воздействие .....	18
1.2.3.2. Проопухолевое воздействие .....	19
1.3 Хемилюминесцентный анализ.....	20
2 Материалы и методы исследования.....	23
2.1 Объект исследования .....	23
2.2 Метод выделения нейтрофильных гранулоцитов .....	23
2.3 Хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов .....	24
2.3 Статистический анализ.....	26
3 Результаты исследования .....	27
Заключение .....	37
Список использованной литературы.....	38

## РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Показатели хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов при раке желудка» состоит из 44 страниц, 3 таблиц, 7 иллюстраций и 54 библиографических источников.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, хемилюминесцентная активность, респираторный взрыв, рак желудка.

Целью настоящей работы явилось изучить особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов при раке желудка в зависимости от стадии.

В ходе исследования было выявлено, что при спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов наблюдается статистически значимое снижение показателя максимума интенсивности, увеличение времени выхода кривой на максимум интенсивности и площади под кривой хемилюминесценции относительно всех стадий заболевания. Максимальные значения данных параметров проявляются у больных раком желудка на IV стадии. При индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов статистически значимые различия были выявлены среди показателей площади под кривой хемилюминесценции всех стадий развития рака желудка, с закономерным увеличением данного показателя при прогрессировании заболевания. Наблюдалось увеличение показателей индекса активации среди всех стадий развития рака желудка. Максимальные значения данных показателей так же выявлялись на IV стадии рака желудка;

Корреляционный анализ продемонстрировал снижение показателя максимального значения спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при прогрессировании рака желудка. Выявлено прямо пропорциональное увеличение показателя площади под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции и индекса активации с прогрессированием рака желудка.

## **Введение**

Рак желудка является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний [1]. По данным GLOBOCAN на 2020 год, было выявлено свыше миллиона новых случаев развития рака желудка [2, 3]. Порядка 80% случаев данного заболевания заканчивается летальным исходом. В связи с этим, рак желудка занимает 5-ое место по распространенности в мире и 4-ое по летальности среди всех онкологических заболеваний [1, 4, 5, 6, 7].

Страна, в которой установлена наибольшая частота встречаемости рака желудка – Япония [2, 8, 9]. В Российской Федерации рак желудка занимает 4-ое место по заболеваемости среди мужчин (7,8%) и 5-ое среди женщин (4,8%). По летальности, данное заболевание достигает 2-ого места среди обоих полов [10].

Более 70% случаев рака желудка диагностируется на III-IV стадии развития, в связи с чем значительно усложняется терапия данных пациентов и повышается риск летального исхода [11, 12]. Имеющиеся данные обуславливают необходимость поиска новых способов диагностирования рака желудка на ранних стадиях и методов его лечения.

Участие неспецифического звена иммунитета и роль нейтрофильных гранулоцитов в канцерогенезе в настоящее время оцениваются неоднозначно. Установлено, что нейтрофильные гранулоциты способны оказывать как противоопухолевое, так и проопухолевое воздействие в зависимости от вида и стадии канцерогенеза [14].

Нейтрофилы являются эффекторными клетками врожденного иммунитета, способствующими уничтожению опухоли за счет цитотоксического воздействия содержимого гранул. Так же данные клетки способны реализовывать противоопухолевое действие за счет образование внеклеточных нейтрофильных ловушек - NET. Цитокины, вырабатываемые нейтрофильными гранулоцитами способствуют активации других эффекторных клеток. Одновременно нейтрофильные гранулоциты способны активировать процесс неоангиогенеза, инвазии опухолевых клеток и подавления T-клеточного иммунитета [15, 16].

На направление действия нейтрофильных гранулоцитов влияет микроокружение опухоли. В зависимости от вида, локализации и стадии развития злокачественной опухоли, нейтрофильные гранулоциты могут подразделяться на две фенотипически разные популяции: противоопухолевого (N1) и проопухолевого воздействия (N2). Установлен факт перехода нейтрофильных гранулоцитов из одной популяции в другую под влиянием микроокружения опухоли [17, 18, 19].

Хемилюминесцентный анализ позволяет исследовать функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов за счет детекции интенсивности, скорости и продолжительности образования активных форм кислорода [16].

Целью настоящей работы явилось изучить особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов при раке желудка в зависимости от стадии.

Исходя из поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1) Оценить показатели спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка на различных стадиях по отношению к контрольной группе.

2) Проанализировать показатели индуцированной хемилюминесценции и индекса активации у больных раком желудка в зависимости от стадии относительно контрольной группы.

3) Выявить корреляции среди показателей спонтанной и индуцированной хемилюминесценции больных раком желудка и контрольной группы по отношению к стадии развития рака желудка.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Рак желудка**

Рак желудка – это онкологическое заболевание, при котором происходит развитие злокачественного новообразования из клеток слизистой оболочки желудка [20].

Внутренняя слизистая оболочка желудка состоит из трех слоев: однослойного призматического железистого эпителия, собственной и мышечной пластинок [21]. Однослойный призматический железистый эпителий выстилает желудочные ямки, в которых располагаются пилорические, фундальные, кардиальные железы, необходимые для секреции серотонина, мотилина, пепсиногена, соляной кислоты, муцина и некоторых других веществ.

Из большинства клеток призматического железистого эпителия возможно развитие рака под воздействием этиологических факторов и факторов риска, с последующим его прогрессированием на нижележащие слои желудочной стенки [9]. Развитие злокачественной опухоли может идти в соответствии с каскадом Correa либо по иным механизмам прогрессирования [22].

Рак желудка способен развиваться в любом отделе желудка, распространяться на мышечный и серозный слои и переходить на прилежащие органы – пищевод, двенадцатиперстную кишку [10].

Кроме того, пораженный раком орган способен давать отсевы в ближайшие лимфатические узлы, создавая регионарные метастазы. Так же, опухолевые клетки могут попасть через кровь в иные органы человека, не находящиеся в непосредственной близости к желудку - легкие, печень и т.д. В данном случае происходит формирование отдаленных метастазов [10, 21].

#### **1.1.1 Классификация рака желудка**

Наиболее часто встречаемой классификацией рака желудка является гистологическая классификация P. Lauren, по которой рак желудка подразделяется на три типа: интестинальный или кишечный, недифференцированный или диффузный и смешанный типы [4, 9, 23].

Рак желудка интестинального типа характеризуется схожим строением опухоли с таковой рака кишки. В данном случае наблюдается преобразование кубического железистого эпителия слизистой оболочки желудка в железистый цилиндрический эпителий, характеризующийся наличием мерцательных ворсинок на апикальной стороне клеток [20]. Для интестинального рака желудка характерен предшествующий атрофический гастрит с кишечной метаплазией, что соответствует каскаду Correa [24, 7].

Недифференцированный тип рака желудка возникает в следствии пангастрита без атрофии и представляет собой отдельные железистые клетки, активно вырабатывающие слизистое вещество - муцин, либо группы данных клеток, слабо взаимосвязанных между собой [20, 24].

Смешанный тип предполагает одновременное проявление характерных черт первого и второго типов рака желудка в различном соотношении. Данный тип рака желудка является наиболее распространенным среди всех выявленных случаев [24].

Кроме гистологической классификации рака желудка, существует классификация по его анатомическому расположению. Выделяют проксимальный (кардиальный) и дистальный (некардиальный) рак желудка [1, 24].

Проксимальный рак желудка развивается в области нижнего пищеводного сфинктера - кардии. На долю проксимального рака желудка приходится порядка 10 % случаев выявления рака желудка. Дистальный рак желудка, встречаемый около 90% случаях, - в средних и нижних отделах желудка [25]. Порядка 60% случаев дистального рака желудка приходится на антральный отдел желудка.

### **1.1.2 Этиология и факторы риска рака желудка**

В настоящее время этиология развития рака желудка окончательно не выяснена. Наиболее часто встречаемым этиологическим фактором рака желудка среди различных научных статей является *Helicobacter pylori*. В настоящее время установлено увеличение частоты развития рака желудка в 5,9

раз в течении десяти лет после инфицирования людей данной бактерией. Данный патогенный микроорганизм, при попадании в желудок условно здорового человека, способен инициировать развитие хронического гастрита. Начинается данный процесс с воспалительной инфильтрации в слизистую оболочку желудка с последующим изменением ее секреторной функции, что в дальнейшем может привести к раку желудка в соответствии с каскадом Correa [26, 9]. Выявлено, что около 90% случаев дистального рака являются ассоциированными с *Helicobacter pylori* [1].

Однако, в настоящее время установлены случаи развития неассоциированного с *Helicobacter pylori* рака желудка и случаи отсутствия развития заболевания при инфицировании данной бактерией в течении длительного времени, что говорит о не абсолютности данного этиологического фактора и ставит под вопросом его положение относительно этиологических факторов, а не факторов риска.

К этиологическим изменениям слизистой оболочки желудка относят кишечную метаплазию и эпителиальную дисплазию. Данные изменения являются предраковыми и характеризуются структурной перестройкой СОЖ с изменением функционирования и дифференцировки ее составляющих эпителиальных клеток, а также появлением первых опухолевых маркеров.

Факторами риска развития рака желудка принято выделять: злоупотребление алкоголем; курение; неправильное питание- преобладание в рационе соленой, копченой и консервированной пищи, пищевых нитратов и нитрозосодержащих компонентов, недостаточное употребление фруктов и овощей (или полное их отсутствие в рационе); ожирение; резекция желудка в анамнезе и некоторые другие факторы риска [1, 9, 8].

По данным исследований в области этиологии рака желудка было установлено, что курение увеличивает риск развития данного заболевания в 1,53 раза ввиду образования в организме N-нитрозосоединений.

Увеличение риска развития рака желудка при курении, как и при употреблении большого количества алкоголя, пищевых нитратов и



нитрозосодержащих соединений связано с процессом всасывания нитратов клетками слизистой оболочки желудка и дальнейшим их преобразованием. Данный процесс протекает в несколько этапов. Изначально нитраты всасываются клетками желудочной стенки. Далее данные вещества выделяются слюнными железами в ротовую полость, где имеются бактерии, содержащие нитратредуктазу. Данный фермент восстанавливает нитраты до нитритов. Нитриты в свою очередь реагируют с амидами, аминами и аминокислотами с образованием N-нитрозосоединений. В большинстве N-нитрозосоединениями в данном случае являются нитрозамины и нитрозамиды [9].

N-нитрозосоединения являются опасными для человека ввиду своих канцерогенных, тератогенных и мутагенных свойств, способствующих развитию и прогрессированию рака желудка [9].

Ожирение увеличивает риск в 1,13 раза, при этом вероятность возникновения опухоли увеличивается с повышением показателя ИМТ, тогда как употребление достаточного количества фруктов и овощей способно снизить данный показатель на 37% [1, 27]

Ожирение способно влиять на увеличение риска развития данного онкологического заболевания посредством работы фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкина-6 (IL-6) и белка-1 хемоаттрактанта моноцитов (MCP-1), вызывая с помощью них воспаление слизистой оболочки желудка, способное в дальнейшем привести к раку желудка [1, 9, 8].

Употребление необходимого количества фруктов и овощей способствует снижению риска заболеваемости раком желудка ввиду наличия в данных продуктах каротиноидов, фолатов, фитохимических веществ, витамина С - способствующих модуляции ферментов, метаболизирующих ксенобиотики во время пищеварения [9]. Кроме того, данные вещества выполняют роль природных антиоксидантов, дефицит которых может приводит к гиперпродукции активных форм кислорода, развитию оксидативного стресса и повреждению ДНК эпителиоцитов, способствующему опухолевому перерождению клетки.

Избыточное потребление соленой пищи способствует повреждению клеток стенки желудка. Данные повреждения увеличивают проницаемость клеток и способствуют усилению воздействия канцерогенных факторов. Так же установлено, что данный фактор риска взаимосвязан с увеличением заболеваемости *Helicobacter pylori*, а их совместное воздействие на слизистую оболочку желудка способствует ускорению гистологических преобразований, приводящих к появлению злокачественной опухоли [9].

К эндогенным факторам риска относят генетические изменения, приводящие к развитию наследственного рака желудка. Изменения на генетическом уровне могут приобретаться как в качестве спонтанной мутации в определенных генах и неправильной работе систем репарации клетки, так и в следствии воздействия ионизирующего излучения и радиации, химических веществ и т.д.

### **1.1.3 Патогенез рака желудка**

В большинстве случаев рак желудка начинается с инфицирования условного здоровых людей *Helicobacter pylori* в течении длительного времени. В следствие данного инфицирования запускается многоступенчатый гистопатологический каскад изменений слизистой оболочки желудка, описанный Р. Correa в 1988 году. В соответствии с данным каскадом в патогенезе рака желудка принято выделять следующие стадий: хронический поверхностный гастрит, хронический атрофический гастрит, кишечная метаплазия, дисплазия и рак желудка [22, 23].

*Helicobacter pylori* способна внедряться в слизистый слой желудка, обеспечивающий защиту стенок желудка от воздействия кислой среды и ферментов желудочного сока, и колонизироваться на слизистой оболочке желудка [23, 28, 29]. После закрепления, бактерия начинает вырабатывать уреазу, происходит увеличение концентрации аммиака и повышение рН слизистого защитного слоя [28]. Данное явление вызывает увеличение секреции гастрина, соляной кислоты и пепсина, с одновременным снижением секреции

бикарбонатов. Вырабатываемые бактерией муциназа, протеаза и липаза способствуют разрушению защитного слоя слизи желудка, в следствие чего желудочный сок получает непосредственный доступ к слизистой оболочке желудка, что способствует развитию воспаления и хронического поверхностного гастрита [26, 1].

Хронический поверхностный гастрит является морфологическим диагнозом, указывающим на воспалительный процесс слизистой оболочки желудка [26, 29]. При прогрессировании, данное заболевание способно вызвать атрофию железистого эпителия и перейти в хронический атрофический гастрит [23].

Хронический атрофический гастрит характеризуется гибелью главных и париетальных клеток и значительным истончением слизистой оболочки желудка. Вследствие уменьшения количества данных клеток в слизистой оболочке желудка происходит снижение секреции соляной кислоты, пепсиногенов, гастромукопротеина-главных участников пищеварения [30].

В результате истончения слизистой оболочки желудка происходит запуск процессов регенерации клеток. Данный процесс может являться патологическим и быть причиной развития кишечной метаплазии [22].

Метаплазия характеризуется заменой одного дифференцированного типа клеток на другой тип клеток, в норме не присутствующий в данной ткани [28, 31]. В случае кишечной метаплазии желудка происходит замена железистого эпителия желудка на клетки сходные по строению с железистыми эпителиальными клетками кишечника [22].

Дисплазия характеризуется наличием участков эпителия с ярко выраженными цитологическими и структурными аномалиями клеток. В частности, при дисплазии слизистой оболочки желудка наблюдается снижение содержания слизистого вещества - муцина в составе эпителиальных клеток, значительное повышение их плотности, что приводит к увеличению показателя ядерно-цитоплазматического коэффициента. Так же наблюдается появление

гиперхромности ядер, учащение процессов митоза, прогрессирующее нерегулярное ветвление желёз с расширением их просвета [32]. Дисплазия желудка является непосредственно предраковым состоянием, приводящим по итогу к раку желудка.

Согласно классификации TNM выделяют 4 основные стадии рака желудка. В практически всех из них наблюдается разделение на несколько подстадий, в зависимости от глубины инвазии опухоли, наличия метастазов в лимфоузлах и отдаленных органах [20].

Первая стадия развития рака желудка характеризуется поражением собственной пластинки или мышечной пластинки слизистой оболочки, подслизистого слоя желудка. При этом либо вовсе отсутствуют метастазы в регионарных лимфоузлах, либо наблюдается поражение 1-2-х регионарных лимфоузлов.

На второй стадии развития рака желудка отмечается поражение мышечного слоя желудка, в некоторых случаях поражение серозной оболочки (если при этом не наблюдается поражения регионарных лимфоузлов). Так же к опухолям этой группы относятся опухоли с инвазией желудочно-ободочной и желудочно-печеночной связки, большого и малого сальников без поражения висцеральной брюшины, если отмечается отсутствие поражения регионарных лимфоузлов либо поражение 1-2 регионарных лимфоузлов. При малой степени инвазии (до мышечного слоя), ко второй стадии рака желудка относят случаи с поражением от 7 и более регионарных лимфоузлов.

На третьей стадии развития рака желудка отмечается возможность поражения серозного слоя желудка и соседних органов и структур. При этом должно отсутствовать поражение регионарных лимфоузлов, либо в количестве 1-2-х. При меньшей степени инвазии может наблюдаться сильное поражение регионарных лимфоузлов – от 7 и более.

К последней, четвертой стадии относятся любые случаи инвазии опухоли и поражения регионарных лимфоузлов при наличии метастазов в отдаленных

органах [20]. При обнаружении у пациента рака желудка на данной стадии процент пятилетней выживаемости крайне низок.

## **1.2 Роль нейтрофильных гранулоцитов в развитии рака желудка**

Раковые клетки являются клетками собственного организма, имеющими сбои в генной регуляции, в следствии которой осуществляется переход к интенсивному неупорядоченному делению и деградации изначально выполняемых функций. Вследствие быстрой и бесконтрольной пролиферации возникает ситуация недостатка кислорода и питательных веществ в окружающей среде. Ввиду данного дефицита опухолевые клетки переходят к инвазии и метастазированию, распространяясь по всему организму.

При перерождении клеток в раковые происходит продукция определенных опухолевых маркеров, позволяющих клеткам иммунитета распознать и уничтожить новообразованные неправильно функционирующие клетки [41].

Иммунный ответ организма на опухолевые клетки или патогенные микроорганизмы начинается с доиммунного воспаления, значимую роль в котором играет фагоцитоз. Одними из главных клеток неспецифического иммунитета в организме человека, выполняющими данную функцию, являются нейтрофильные гранулоциты [42,43].

### **1.2.1 Характеристика нейтрофильных гранулоцитов**

Нейтрофильные сегментоядерные лейкоциты или нейтрофильные гранулоциты - это эффекторные клетки системы естественной противоопухолевой резистентности, составляющие 50-70% от числа всех лейкоцитов циркулирующих в крови ( $2,0 — 7,5 \times 10^9$  нейтрофилов/л крови), способные оказывать цитотоксическое действие на раковые клетки [42, 44, 15, 45].

Данные клетки являются коротко живущими - от нескольких часов до нескольких дней. В кровеносном русле нейтрофильные гранулоциты в среднем находятся порядка 6-8 часов, далее мигрируя в ткани организма. После

миграции нейтрофилы не способны обратно вернуться в кровоток и разрушаются непосредственно в тканях.

Нейтрофильные гранулоциты характеризуются наличием четырех типов гранул в цитоплазме, различающихся ферментативным составом. Среди гранул выделяют азурофильные или первичные, специфические или вторичные, желатиназные или третичные и секреторные гранулы или везикулы. Азурофильные и специфические гранулы отвечают за расщепление вредоносного агента, желатиназные - за выход нейтрофилов за пределы кровеносного русла в ткани, секреторные – за восстановления нарушенной мембраны нейтрофилов.

На поверхности нейтрофила находится большой спектр рецепторов, необходимых для выполнения основной функции клетки - фагоцитоза. Это рецепторы адгезии, хемотаксиса и трансмиграции; рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулинов; специфичные типы рецепторов на раково-эмбриональные антигены семейства СЕА и многие другие [46]. Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов напрямую зависит от количества и плотности распределения рецепторов на плазмалемме данных клеток [15].

### **1.2.2 Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов**

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов является ключевой в процессе уничтожения патогенных агентов. Процесс фагоцитоза вредоносного объекта нейтрофилами включает несколько стадий: движение в очаг воспалений, адгезия к фагоцитируемому объекту, дегрануляция азурофильных и специфических гранул в фагосому, образование активных форм кислорода в фаголизосоме, киллинг и расщепление объекта фагоцитоза [39].

Нейтрофилы первыми реагируют на воспаление, спровоцированное вредоносным объектом (патогенном из окружающей среды или собственными опухолевыми клетками), и начинают двигаться в направлении данного очага воспалений [15, 45]. Происходит данное движение из-за того, что патоген или опухолевые клетки начинают выделять хемоаттрактанты (в основном этими

веществами являются бактериальные N-формилпептиды, C3a и C5a компоненты комплемента, ФАТ, интерлейкин-8), привлекающие эффекторные клетки врожденного иммунитета [46]. Хемоаттрактанты способны воздействовать на различные клетки иммунной системы, изменяя их скорость и направление движения. В частности, движение клеток осуществляется по градиенту концентрации – наблюдается процесс хемотаксиса. Данное однонаправленное движение позволяет нейтрофильным гранулоцитам и иным клетками иммунной системы накапливаться в микроокружении опухоли.

Адгезия нейтрофильных гранулоцитов к фагоцитируемому объекту происходит благодаря ряду поверхностных рецепторов (о которых упоминалось ранее), обеспечивающих гидрофобное взаимодействие между фагоцитом и объектом фагоцитоза [47]. После сцепления поверхностей нейтрофила и вредоносного объекта происходит образование фagosомы вокруг данного патогена или опухолевой клетки.

Далее следует стадия дегрануляции заключающаяся в сливании стенок фagosомы со стенками гранул и высвобождением содержимого для последующего киллинга вредоносного объекта. При этом сначала происходит высвобождение содержимого специфичных гранул, а после азурофильных. Необходима данная последовательность для обеспечения максимальной эффективности переваривания [39].

Стадия киллинга может осуществляться как кислородонезависимым так и кислородозависимыми механизмами фагоцитоза [47]. Первый механизм фагоцитоза является менее эффективным способом киллинга по сравнению со вторым.

Кислородонезависимый механизм фагоцитоза протекает в результате высвобождения содержимого специфичных гранул, в составе которых основную часть составляют лактоферрин и лизоцим, и азурофильных гранул, выделяющих катионные белки, протеиназы (например, эластазу и коллагеназу), катепсин G, дефензины и другие вещества. В следствии выделения данных веществ в фagosому, содержащую в себе фагоцитируемый объект, происходит

повреждения его клеточных мембран, нарушение метаболических процессов и переваривание объекта [39].

Кислородозависимый механизм сопряжен с понятием «респираторного взрыва» - метаболического процесса, конечными продуктами которого являются активные формы кислорода (АФК), имеющие бактерицидные свойства и цитотоксический эффект на опухолевые клетки [15, 42, 46].

Начинается данный механизм с активации сборки фермента НАДФН-оксидазы комплексом цитоплазматической мембраны. Активаторами процесса сборки являются сигналы, возникающие при связывании лигандов с рецепторами мембраны. Далее следует реакция одноэлектронного восстановления молекулы кислорода до супероксидного анион радикала  $\cdot\text{OO}^-$  (САР) - главного источника всех радикалов, обусловленная НАДФН-оксидазой [41].

Супероксидный анион радикал является крайне реактивным первичным радикалом. Данное его свойство позволяет за считанные секунды реагировать с различными соединениями и преобразовываться в молекулярные продукты. Фермент антиоксидантной системы защиты клеток, – супероксиддисмутаза - находящийся в нейтрофильных гранулоцитах в норме и регулирующий работу супероксид анион радикала, превращает САР в пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Одной из функций супероксид анион радикала является превращение трехвалентного железа ферритина, цитохромов и иных биологических комплексов, содержащих железо, в двухвалентное. Двухвалентное железо является активным участником образования активных форм кислорода, в частности, оно способствует образованию гидроксид радикала  $\cdot\text{OH}$  при взаимодействии с перекисью водорода. Кроме того, двухвалентное железо реагирует с различными липогидропероксидами, что способствует разветвлению путей липидного окисления [49].

Гидроксил радикал может активировать процесс перекисного окисления с выработкой липидных радикалов. Липидные радикалы и радикалы гидроксила являются вторичными радикалами. В результате всех данных реакций в



организме происходит накопление достаточно агрессивных соединений, которые носят название активных форм кислорода.

Гипохлорит ClO является так же продуктом цепной окислительной реакции, запускаемой АФК, и наиболее значим в лизисе опухолевых клеток. Отдельно стоит отметить активные формы азота, прежде всего высшие окислы азота и пероксинитрит, которые так же выполняют окислительную функцию, но в меньшей степени, чем АФК. Однако некоторые авторы выделяют данные вещества отдельно как активные формы хлора и активные формы азота [50].

Активные формы кислорода являются высоко реактивными соединениями, способными так же к продукции иных форм окисления, что обеспечивает их непосредственную цитотоксичность при активации нейтрофильных гранулоцитов [41, 42].

Конечным этапом завершено фагоцитоза является деградация поглощенных и убитых вредоносных объектов. Реализуется данный процесс помощью кислых гидролаз, к которым относят катепсины, липазы и гликозидазы, а также лизоцима и других ферментов, содержащиеся в фаголизосоме после стадии эндоцитоза [39].

После завершения расщепления фагоцитируемого объекта начинается процесс экзоцитоза, с последующим повреждением возбудителей и зачастую собственных тканей [14]. Данный процесс происходит за счет перемещения гранул к периферии нейтрофила, где происходит слияние их фосфолипидного бислоя с клеточной мембраной и непосредственно выброс содержимого данных гранул из клетки [39].

### **1.2.3 Воздействие нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые клетки**

Установлено, что нейтрофильные гранулоциты способны проявлять как противоопухолевую, так и проопухолевую активность, в зависимости от типа и стадии онкологического заболевания. При раке желудка было выявлено, что на первых стадиях развития нейтрофильные гранулоциты сохраняют свою

активность и выполняют нативную для них функцию фагоцитоза и экзоцитоза активных веществ для уничтожения клеток, переродившихся в злокачественные. При этом на поздних стадиях развития наблюдается противоположная картина – нейтрофильные гранулоциты перестают выполнять функцию фагоцитоза против опухолевых клеток и начинают выполнять проопухолевую функцию.

### **1.2.3.1 Противоопухолевое воздействие**

Как было сказано ранее, на первых стадиях развития рака желудка наблюдается активное выполнение нейтрофильными гранулоцитами противоопухолевой функции. Опухолевые клетки выделяют в микроокружение различные вещества, которые в свою очередь являются хемокинами для нейтрофильных гранулоцитов. Нейтрофильные гранулоциты за счет хемотаксиса достигают опухоли и накапливаются в ее микроокружении.

Достигая микроокружения опухоли нейтрофильные гранулоциты реализуют свой цитотоксический и цитолитический эффект по отношению к перерожденным злокачественным клеткам. Кроме того, нейтрофильные гранулоциты способны вырабатывать различные цитокины, активирующие иные эффекторные клетки.

Основное цитотоксическое воздействие нейтрофильных гранулоцитов производится посредством активации секреторной дегрануляции рецепторным каскадом клетки, а так же посредством процесса антителозависимого киллинга [23, 36, 50].

По фенотипу опухоль ассоциированные нейтрофильные гранулоциты подразделяются на N1 TANs и N2 TANs. Первый тип нейтрофильных гранулоцитов выполняет непосредственно противоопухолевую функцию. Данные клетки имеют гиперсегментированное ядро, большее количество гранул и более развитый аппарат Гольджи, необходимый для интенсивного синтеза цитокинов и хемокинов. Кроме того, наблюдается сниженное содержание аригиназы в гранулах.

N1 TANKs более активно реализуют цитотоксический ответ по отношению к опухолевым клеткам, по сравнению с N2 TANKs. Кроме того, отмечается, что данные нейтрофильные гранулоциты промотируют Т-клеточную активацию [42, 47].

### **1.2.3.2. Проопухолевое воздействие**

На поздних стадиях развития рака нейтрофильные гранулоциты начинают реализовывать проопухолевое воздействие [14]. В частности, данный факт опосредуется сменой фенотипа нейтрофильных гранулоцитов на N2 TANKs под воздействием ростового фактора опухоли (TGF- $\beta$ ), который имеет высокую концентрацию в микроокружении опухоли.

Активные формы кислорода, вырабатываемые нейтрофильными гранулоцитами, могут способствовать не только цитотоксичности данных клеток и элиминации антигена, но и поломкам генетического материала нормальных эпителиальных клеток, повышая уровень мутагенеза, усиливая неоангиогенез и способствуя прогрессированию и метастазированию опухоли.

Кроме активных форм кислорода, ангиогенезу, инвазии и процессам образования метастазов опухоли могут способствовать непосредственно и ферменты, содержащиеся в гранулах нейтрофильных гранулоцитов, в частности выполняющих протеолитическую функцию. Особое место среди данных ферментов отдается матриксным металлопротеиназам – 9 и – 13. Данные ферменты способны преобразовывать межклеточный матрикс, ввиду чего металлопротеиназа – 9 является ключевым медиатором ангиогенеза. Кроме того, данный фермент обуславливает активацию избыточной пролиферации эндотелиоцитов сосудов.

Установлено, что нейтрофильные гранулоциты растворяют межклеточное вещество за счет процессов дегрануляции протеолитических ферментов, что непосредственно помогает опухолевым клеткам мигрировать среди клеток. Далее нейтрофильные гранулоциты могут облегчать преодоление эндотелиального барьера злокачественными клетками, способствуя их миграции

по кровеносному руслу и образованию отдаленных метастазов [36].

Активные формы кислорода при реализации цитотоксического воздействия способны затрагивать и здоровые эпителиальные клетки, разрушая их мембраны, приводя к активации системы апоптоза. Однако, иногда активные формы кислорода способны проникать внутрь клетки и повреждать ядерный аппарат – хроматин, нити ДНК. Данные повреждения способны вызывать различного рода мутации, в том числе в генах, отвечающих за активацию апоптоза и ограничивающих количество делений клетки. Таким образом АФК имеют канцерогенные свойства, т.е. способны к образованию новых беспорядочно делящихся и не имеющих конечной дифференциации опухолевых клеток.

В некоторых случаях цитокины, вырабатываемые нейтрофильными гранулоцитами способны оказывать содействие прогрессированию опухоли. Было установлено, что выработка интерлейкина – 15 стимулирует ускоренное развитие лимфом у мышей. Интерлейкин - 6 принимает участие в прогрессировании и метастазировании опухоли. Фактор некроза опухоли является ключевым относительно проопухолевого воздействия нейтрофильных гранулоцитов, оказывая прямое влияние на процессы неоангиогенеза. Кроме того, секретируемые цитокины нейтрофильными гранулоцитами в окружающую среду способствуют привлечению иных воспалительных клеток, которые могут так же способствовать прогрессированию опухоли и подавлению Т-клеточного иммунитета [45].

### **1.3 Хемилюминесцентный анализ**

Хемилюминесцентный анализ является видом люминесцентного анализа, основанный на оценке интенсивности свечения пробы или объекта. Свечение пробы возникает в следствие выделения квантов света при реакции восстановления окисленных молекул реакции до стабильного состояния [52].

В качестве объектов исследования при данном виде люминесцентного анализа используются изолированные клетки, способные к самостоятельному

свечению (в нашем исследовании были использованы нейтрофилы) и биологические жидкости, в составе которых могут находиться окисленные молекулы продуктов реакции, либо соединения, способные к данным окислительным реакциям с последующим восстановлением (цельная, периферическая кровь, сыворотка и плазма, синовиальная жидкость и тд) [51].

Хемилюминесцентный анализ используют для изучения состояния и свойств различных клеток (в частности эффекторных клеток врожденного иммунитета), оценки состояния врожденного иммунитета от действия химических или лекарственных средств на организм, а также для мониторинга состояния пациентов и диагностики заболеваний.

Данный анализ позволяет получать информацию о нативном состоянии и функциональной активности клеток. Хемилюминесцентный анализ обычно не связан с изменениями реакций в растворах, клетках или тканях, где детектируется свечение, высокочувствителен, что позволяет регистрировать и характеризовать интенсивность «респираторного взрыва» нейтрофилов даже при исчерпывающе малых концентрациях высокореакционных радикалов [51].

Окислительные реакции «респираторного взрыва» играют важную роль в регуляторной и защитной функциях нейтрофилов, поскольку их продуктами являются АФК, необходимые для проведения наиболее эффективного процесса киллинга вредоносных объектов, которыми в том числе могут являться опухолевые клетки [49, 51, 53].

Оценка интенсивности синтеза АФК нейтрофилами может производиться хемилюминесцентным анализом как за счет собственного свечения клеток, так и с помощью различных стимулов свечения. Поскольку собственное свечение нейтрофилов является очень тусклым, необходимо для данной регистрации использовать большое количество пробы. В соответствии с этим многие исследователи используют хемилюминесценцию нейтрофилов с участием стимулов, способствующей снижению количества используемой пробы. Как правило, при анализе свободнорадикальной продукции используется одиночный стимул [52].

Одним из наиболее распространенных химических активаторов в настоящее время является люминол. Люминол обеспечивает хемилюминесценцию за счет собственного окисления и дальнейшего его взаимодействия с пероксидом водорода и гипохлоритом. Данный процесс происходит в восемь стадий, конечным итогом которого является образование молекулы аминопропионовой кислоты в возбужденном состоянии с последующим испусканием света [51].

При низких концентрациях (микромоль в литре) люминол отражает в основном внеклеточную продукцию гипохлорита и пероксида водорода, тогда как при больших концентрациях способен так же отражать и внутриклеточную [50, 52].

Еще одним широко распространённым химическим активатором является люцегинин. Данный активатор реагирует с супероксидным анион-радикалом и пероксидом водорода, усиливает хемилюминесценцию фосфолипидов, которая не инкубируется СОД. Считается, что люцегинин отражает только внеклеточную продукцию супероксидного анион-радикала и пероксида водорода [50].

Хемилюминесцентный анализ нейтрофилов позволяет определить такие показатели, как время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции, характеризующее скорость развития респираторного взрыва в случае регуляторного или антигенного воздействия на клетку, максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, отражающее максимальный уровень синтеза АФК, площадь под кривой хемилюминесценции, характеризующая уровень метаболических резервов для синтеза соответствующих АФК [50, 54]. Данные показатели позволяют описать явление респираторного взрыва у нейтрофильных гранулоцитов, что является не маловажным при изучении течения заболевания и дальнейшего прогнозирования его исхода.

## **2 Материалы и методы исследования**

### **2.1 Объект исследования**

В исследование включено 98 больных с верифицированным диагнозом рак желудка на различных стадиях развития заболевания. Сформировано 4 группы сравнения в соответствии с установленной стадией рака желудка у больных. Группа 1 сформирована из 21 больного раком желудка I стадии. Группа 2 была сформирована из 23 пациентов, больных раком желудка II стадии. Группа 3 сформирована из 28 больных раком желудка III стадии. Группа 4 из 26 пациентов, больных раком желудка IV стадии. Все больные были в возрасте  $51,4 \pm 4,8$  лет. Диагноз устанавливался врачами онкологами. У всех больных раком желудка на различных стадиях типом рака желудка являлась аденокарцинома. Включение больных раком желудка в исследование производилось с их письменным согласием, до начала лечения.

Контрольная группа была сформирована из 85 условно здоровых доноров в возрасте  $47,8 \pm 3,9$  лет без гастроэнтерологических заболеваний и изменений слизистой оболочки желудка.

Материалом исследования стала венозная кровь, забранная у участников исследования из локтевой вены с 8 до 9 утра, натощак, в пробирки Vacutainer с гепарином натрия (5 ЕД/ мл).

Исследование проводилось с разрешения этического комитета НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, с соблюдением этических принципов, указанных в статье №24 Конституции Российской Федерации, Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциацией и Приказе Минздрава Российской Федерации № 266. Участники давали форму информированного согласия на добровольное согласие на участие в исследовании.

### **2.2 Метод выделения нейтрофильных гранулоцитов**

Для выделения нейтрофильных гранулоцитов использовалась венозная кровь, бравшаяся у больного утром с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены.

Перед работой непосредственно с образцами крови в чистые, стеклянные пробирки наливается 2 мл фиколла плотности  $1,119 \text{ г/см}^3$  и 2 мл фиколла плотности  $1,077 \text{ г/см}^3$ . При этом наливание данных растворов друг на друга должно происходить так, чтобы не происходило перемешивания и была видна граница разделения растворов фиколла меньшей и большей плотностей.

Далее на фиколл наливается 2 мл образца исследуемой крови с тем же условием- по итогу наливания должна хорошо прослеживаться граница между образцом крови и растворами фиколла. После все полученные пробирки уравниваются и устанавливаются в центрифугу (использовалась центрифуга Liston C 2204) на 40 минут при 1500 оборотах в минуту.

По истечению данного времени из центрифуги достаются пробирки и переносятся в штативе на предметный стол для дальнейшего сбора популяций клеток. После данного центрифугирования в пробирках хорошо прослеживается расслоение крови на плазму, отдельные популяции. Для выделения нейтрофилов, посредством автопипетки собирается слой с данными клетками в пластиковые пробирки, где изначально находится 2 мл физ. раствора, далее уравниваются пробирки и ставятся в центрифугу на 15 минут при 1500 оборотах в минуту для осаждения нейтрофилов на дно пробирки.

После окончания центрифугирования достаются пробирки и сливается надосадок в специально отведенные для этого емкости. На дне пробирок остается необходимая популяция клеток. К оставшимся в пробирках нейтрофилам добавляется по 1 мл раствора Хенкса для дальнейшего использования данной суспензии в подсчете клеток с посредством микроскопии для хемилюминесцентного анализа.

### **2.3 Хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов**

Хемилюминесцентный анализ нейтрофильных гранулоцитов проводился на биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ -3607 (СНТ-Наука) в течение 1



часа 30 минут непрерывно. В ходе данного анализа наблюдалась выработка активных форм кислорода в динамике, опосредующих хемилюминесцентную активность нейтрофилов. Проводился анализ как спонтанной, так и индуцированной зимозаном хемилюминесценции данных клеток.

Для проведения анализа проводился подсчет в камере Горяева выделенных из венозной крови нейтрофильных гранулоцитов. Для этого использовалось 10 мкл взвеси выделенных нейтрофильных гранулоцитов и 40 мкл уксусной кислоты, обеспечивающей лизис возможной взвеси эритроцитов.

Подсчитывали количество нейтрофильных гранулоцитов в 5 больших квадратах из сетки на камере Горяева по диагонали. Далее для разведения нейтрофильных гранулоцитов до необходимой концентрации (1 млн клеток на 1 мл крови) проводили расчет по формуле:  $(A * 11 * 1000) / 0,02 = (B / 2000000) - 1$  –, где А- количество клеток в 5 квадратах, В-концентрация исследуемых клеток в 1мл суспензии. Полученное число – количество раствора Хенкса, которое необходимо добавить к 1мл суспензии нейтрофильных гранулоцитов.

Для анализа в биохемилюминесцентном анализаторе необходимо в кюветы добавить к 200 мкл суспензии нейтрофильных гранулоцитов (доведенных до концентрации 1 млн клеток на 1 мл) 50 мкл раствора люминола и 240мкл раствора Хенкса в случае диагностики спонтанной хемилюминесценции. При исследовании индуцированной хемилюминесценции необходимо к 200 мкл лейкоцези добавить 40 мкл раствора зимозана, 50 мкл раствора люминола и 240 мк раствора Хенкса.

В ходе хемилюминесцентного анализа определялся время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции ( $T_{max}$ ), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции ( $I_{max}$ ), площадь кривой хемилюминесценции ( $S_{cur}$ ). Индекс активации – показатель усиления хемилюминесценции при индукции зимозаном, установленный в ходе расчета соотношения площади индуцированной ( $S_{cur}$  индуцированной) к площади спонтанной ( $S_{cur}$  спонтанной) хемилюминесценции.

### 2.3 Статистический анализ

По результатам исследований была сформирована база данных и проведен статистический анализ при помощи пакетов программы Statistica 13.3 (StatSoft, США). Для проведения анализа использовалась непараметрическая статистика - сравнение двух независимых групп с помощью теста Манна-Уитни. Вычислялись такие показатели, как: р-значение, медиана (Me) и межквартильный размах (C25-C75). Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

По данным хемилюминесцентного анализа проводился корреляционный анализ для установления зависимости показателей спонтанной и индуцированной хемилюминесценции относительно стадии развития рака желудка. Выявленные значения силы корреляции и р-уровня значимости были сформированы в корреляционную таблицу.

### 3 Результаты исследования

По полученным результатам статистического анализа были сформированы две таблицы сравнения показателей индуцированной и спонтанной хемилюминесценции у групп больных раком желудка на ранних стадиях (табл. 1) и больных раком желудка на поздних стадиях развития заболевания (табл. 2) относительно контрольной группы.

Таблица 1 - Показатели хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с раком желудка на ранних стадиях (I-II стадии) по отношению к контрольной группе.

Показатели	Контрольная группа (1), N=85		РЖ (2) (I стадия), N=23		РЖ (3) (II стадия), N=24	
	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>
I <sub>max</sub> спонтанная (y.e.)	19133	15134-30541	17831	13456-23467	16687,3	11630-24159
T <sub>max</sub> спонтанная (сек.)	969	615-1753	1123	1115-1765	1395	1283-1836
Squr спонтанная (*10 <sup>6</sup> )	0,22	0,15-0,54	3,1	2,4-5,9	5,0	3,39-7,4
I <sub>max</sub> индуцированная (y.e.)	34940	10488-41588	27347	20812-30507	29803	16689-32635
T <sub>max</sub> индуцированная (сек.)	1380,8	796-1586	1432	1410-1789	1394	1304-1505
Squr индуцированная (*10 <sup>6</sup> )	0,4	0,15-0,95	4,5	3,9-5,1	6	5,3-12,8
Индекс активации	1,3	0,9-2,0	2,5	2,1-3,3	2,69	1,37-3,1
			<b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,001</b>		<b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,001</b>	

Примечание:

p<sub>1-2</sub> – статистически значимые различия между показателями больных раком желудка (I стадии) и контрольной группой;

p<sub>1-3</sub> - статистически значимые различия между показателями больных раком желудка (II стадии) и контрольной группой;

В таблицы вносились значения медианы и межквартильного размаха каждого из показателей спонтанной и индуцированной хемилюминесценции - максимума интенсивности хемилюминесценции, времени выхода кривой на

максимум интенсивности хемилюминесценции, площади под кривой хемилюминесценции, индекса активации.

Между полученными значениями спонтанной и индуцированной хемилюминесценции различных групп сравнения были установлены статистически значимые различия при использовании рангового критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2 - Показатели хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с раком желудка на поздних стадиях (III-IV стадии) по отношению к контрольной группе.

Показатели	Контрольная группа (1), N=85		РЖ (2*) (III стадия), N=28		РЖ (3*) (IV стадия), N=27	
	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>
I <sub>max</sub> спонтанная (у.е.)	19133	15134-30541	15327	11987-19876	14236	10987 - 18756
					<b>p<sub>1-3*</sub>&lt;0,05</b>	
T <sub>max</sub> спонтанная (сек.)	969	615-1753	1589	1347-1976	1629	1328 - 2001
			<b>p<sub>1-2*</sub>&lt;0,001</b>		<b>p<sub>1-3*</sub>&lt;0,001</b> <b>p<sub>2-3*</sub>&lt;0,05</b>	
S <sub>qur</sub> спонтанная (*10 <sup>6</sup> )	0,22	0,15-0,54	7,21	4,87-8,3	7,9	5,01-9,0
			<b>p<sub>1-2*</sub>&lt;0,001</b>		<b>p<sub>1-3*</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-3*</sub>&lt;0,001</b>	
I <sub>max</sub> индуцированная (у.е.)	34940	10488-41588	30123	27982-33654	30001	24289 - 36201
T <sub>max</sub> индуцированная (сек.)	1380,8	796-1586	1479	1356-1666	1500	1300 - 1723
S <sub>qur</sub> индуцированная (*10 <sup>6</sup> )	0,4	0,15-0,95	9,3	8,1-9,5	9,7	8,9 – 10,4
			<b>p<sub>1-2*</sub>&lt;0,001</b>		<b>p<sub>1-3*</sub>&lt;0,001</b> <b>p<sub>2-3*</sub>&lt;0,05</b>	
Индекс активации	1,3	0,9-2,0	3,01	2,9-3,4	3,6	3,0-3,9
			<b>p<sub>1-2*</sub>&lt;0,001</b>		<b>p<sub>1-3*</sub>&lt;0,001</b>	

Примечание:

p<sub>1-2\*</sub> - статистически значимые различия между показателями больных раком желудка (III стадии) и контрольной группой;

p<sub>1-3\*</sub> - статистически значимые различия между показателями больных раком желудка (IV стадии) и контрольной группой;

p<sub>2-3\*</sub> - статистически значимые различия между показателями больных раком желудка (IV стадии) и раком желудка (I стадии).

Полученные результаты анализа отражают реализацию и направление функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при отсутствии

патологий и при прогрессировании рака желудка. Показатель максимального значения интенсивности хемилюминесценции свидетельствует об интенсивности образования активных форм кислорода нейтрофильными гранулоцитами. Время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции отражает скорость реализации ответа данными клетками. Площадь под кривой хемилюминесценции позволяет оценить общий пул образующихся активных форм кислорода, их общее содержание. Индекс активации необходим для анализа степени активации иммунной реакции нейтрофильных гранулоцитов при добавлении в среду антигена.

По данным таблицы проводился корреляционный анализ для выявления зависимости показателей спонтанной и индуцированной хемилюминесценции относительно стадии развития рака желудка. Установленные значения были сформированы в корреляционную таблицу (табл.3).

Таблица 3 – Показатели корреляционной зависимости индексов хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов относительно стадии рака желудка.

<b>Показатель</b>	<b>Показатель корреляции, r</b>	<b>p-уровень значимости</b>
I <sub>max</sub> спонтанная (у.е.)	-0,4464	p=0,0195
S <sub>qur</sub> спонтанная (*10 <sup>6</sup> , у.е.)	0,8339	p=0,0001
I <sub>max</sub> индуцированная (у.е.)	-0,2524	p=0,0324
S <sub>qur</sub> индуцированная (*10 <sup>6</sup> , у.е.)	0,8564	p=0,0001
Индекс активации	0,8431	p=0,0001

Полученные данные отражают силу корреляции каждого в отдельности показателя спонтанной и индуцированной хемилюминесценции и стадии прогрессирования рака желудка с указанием p-уровня значимости в каждом случае.

По полученным данным построены гистограммы зависимости, отражающие различия между показателями спонтанной и индуцированной хемилюминесценции различных групп. Гистограммы зависимости показателей построены с использованием данных таблиц 1 и 2.

В ходе анализа была установлена статистически значимая разница между

показателями максимального значения интенсивности спонтанной хемилюминесценции контрольной группы и больных раком желудка IV стадии. Данный показатель снижен по отношению к контрольной группе, что свидетельствует о угнетении интенсивности выработки активных форм кислорода нейтрофильными гранулоцитами на последней стадии развития рака желудка, по сравнению с данной интенсивностью вне патологий.

Между показателями больных I, II, III стадий развития рака желудка не было установлено статистически значимых различий. То же справедливо по отношению данных показателей к контрольной группе и больным раком желудка IV стадии (рис 1).

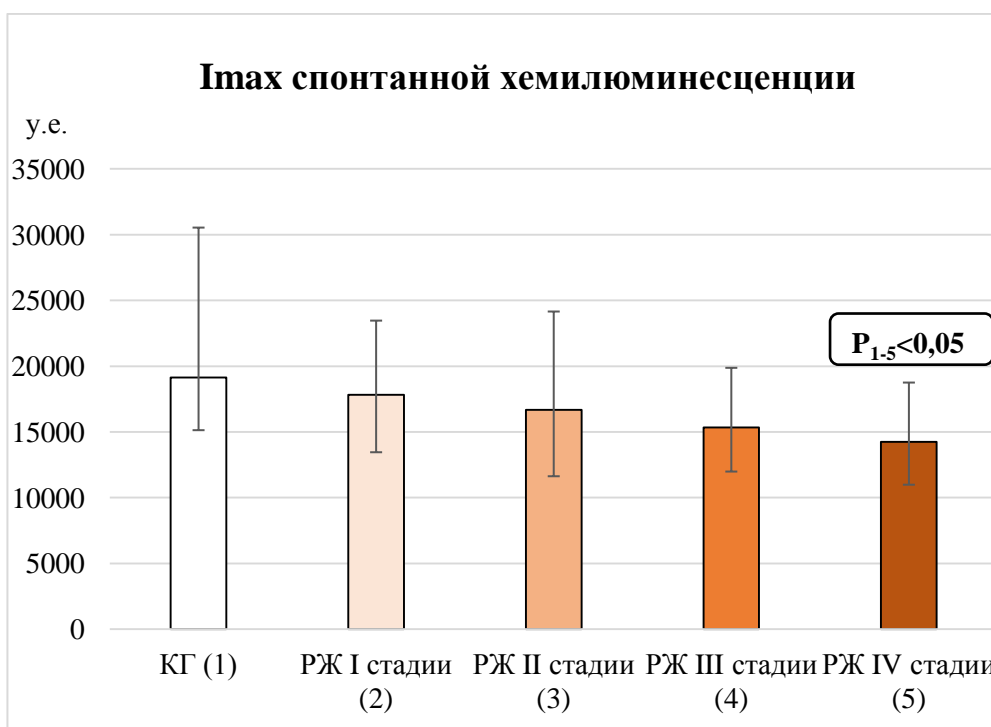


Рисунок 1 – Показатель максимального значения интенсивности спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка относительно контроля.

Выявлено статистически значимое увеличение показателя времени выхода кривой на максимум спонтанной хемилюминесценции у больных раком желудка на I, II, III, IV стадий по отношению к контрольной группе. По данному показателю так же установлено отличие показателей больных раком

желудка I стадии и больных раком желудка IV стадии с увеличением данного значения у последней группы. Между показателями больных раком желудка II и III стадий статистически значимых различий не было установлено, как и по отношению к показателям больных раком желудка I и IV стадий (рис.2).

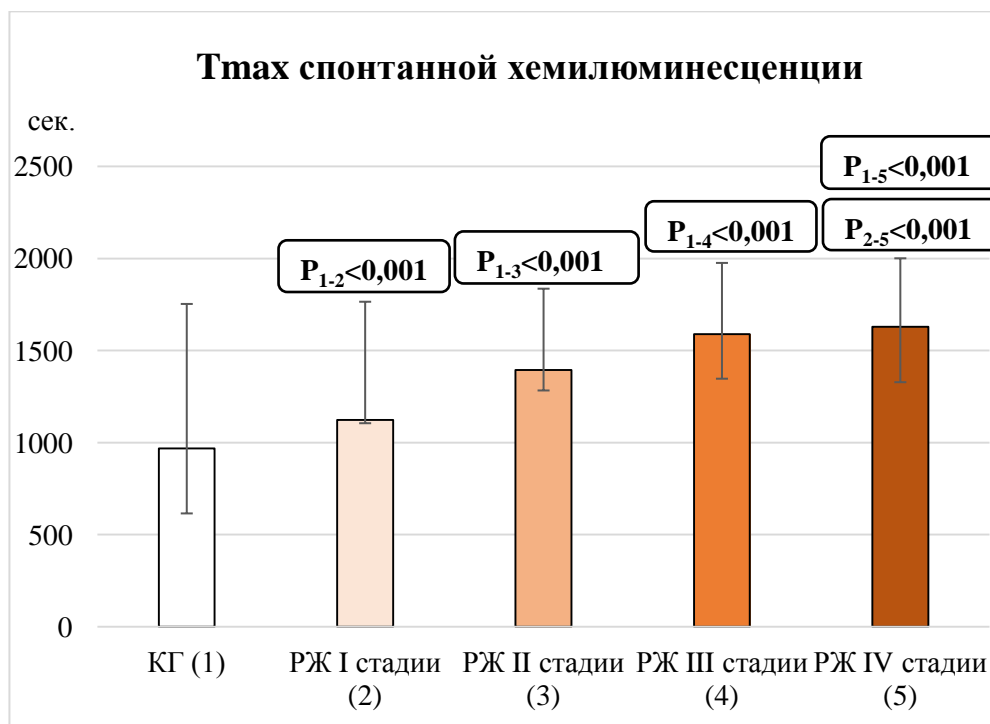


Рисунок 2 – Показатель времени выхода кривой на максимум интенсивности спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка относительно контроля.

Относительно показателя площади под кривой спонтанной хемилюминесценции, отмечается увеличение у больных раком желудка I, II, III и IV стадий по сравнению с контрольной группой. Так же наблюдались статистически значимые различия у показателей больных раком желудка I стадии и больных раком желудка IV стадии. При данном сравнении отмечалось сниженное значение показателя у группы больных раком желудка I стадии.

При статистическом сравнении показателей площади под кривой спонтанной хемилюминесценции у больных раком желудка II и III групп не было установлено разницы в значениях. Кроме того, данные значения не являются статистически отличными от значений показателей больных раком

желудка I и IV стадии, занимая промежуточное положение по медиане между ними (рис.3).

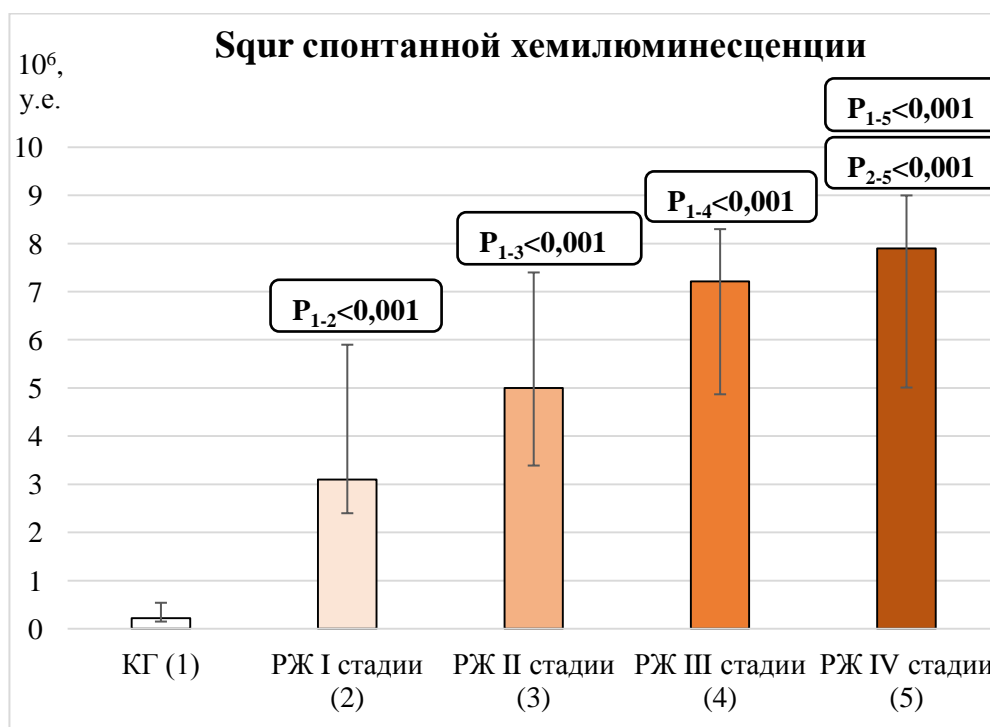


Рисунок 3 – Показатель площади под кривой спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка относительно контроля.

Дополнительная стимуляция «респираторного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов зимозаном в норме приводит к увеличению продукции активных форма кислорода. Соответственно, при отсутствии патологий наблюдается усиление показателей хемилюминесценции, в частности таких, как – максимум интенсивности и площадь под кривой хемилюминесценции.

После индукции хемилюминесцентного ответа опсонизированным зимозаном, показатель максимального значения интенсивности не проявил статистически значимых изменений относительно всех групп сравнения (рис.4). Данное явление свидетельствует о нивелировании разницы между показателем максимального значения интенсивности хемилюминесценции при индукции у больных раком желудка IV стадии и таковым показателем контрольной группы (по сравнению с данными показателями при спонтанной хемилюминесценции).



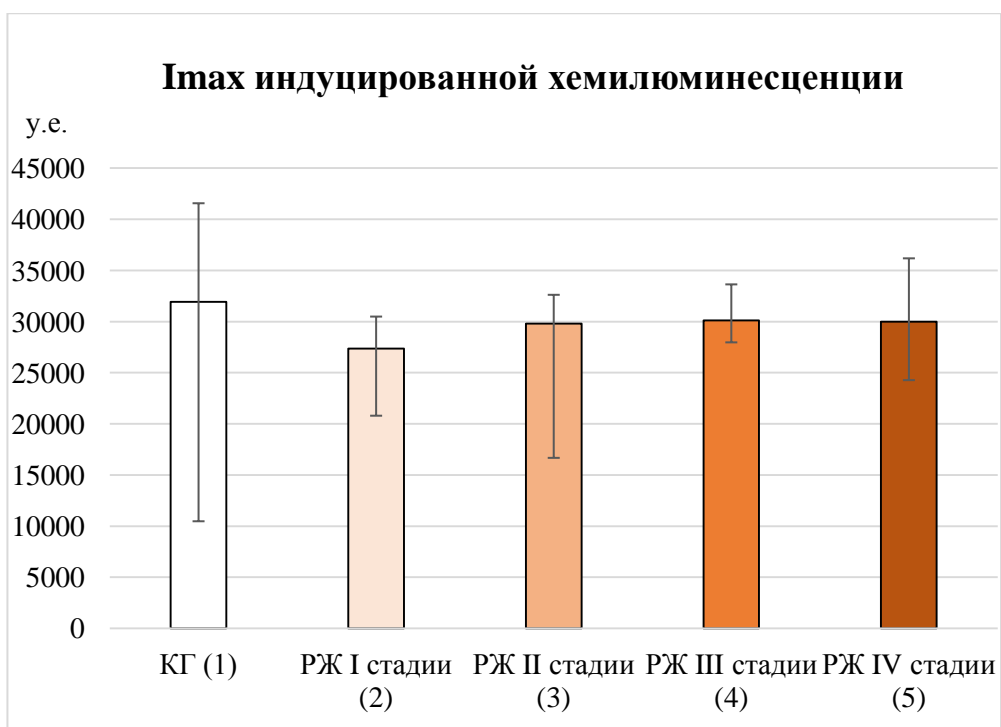


Рисунок 4 – Показатель максимального значения интенсивности индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка относительно контроля.

По показателю времени выхода кривой на максимум интенсивности индуцированной хемилюминесценции так же не было выявлено статистически значимых различий между группами (рис.5). Соответственно, по сравнению с результатами статистического анализа Манна-Уитни при спонтанной хемилюминесценции, показатели времени выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции при индукции статистически сравнялись между группами.

В частности, при сравнении медианных значений данных показателей как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции, можно наблюдать увеличение времени выхода кривой на максимум интенсивности в случае индукции у контрольной группы и группы больных раком желудка I стадии в 1,4 и 1,3 раза соответственно, при относительном сохранении данных значений у остальных групп больных раком желудка.

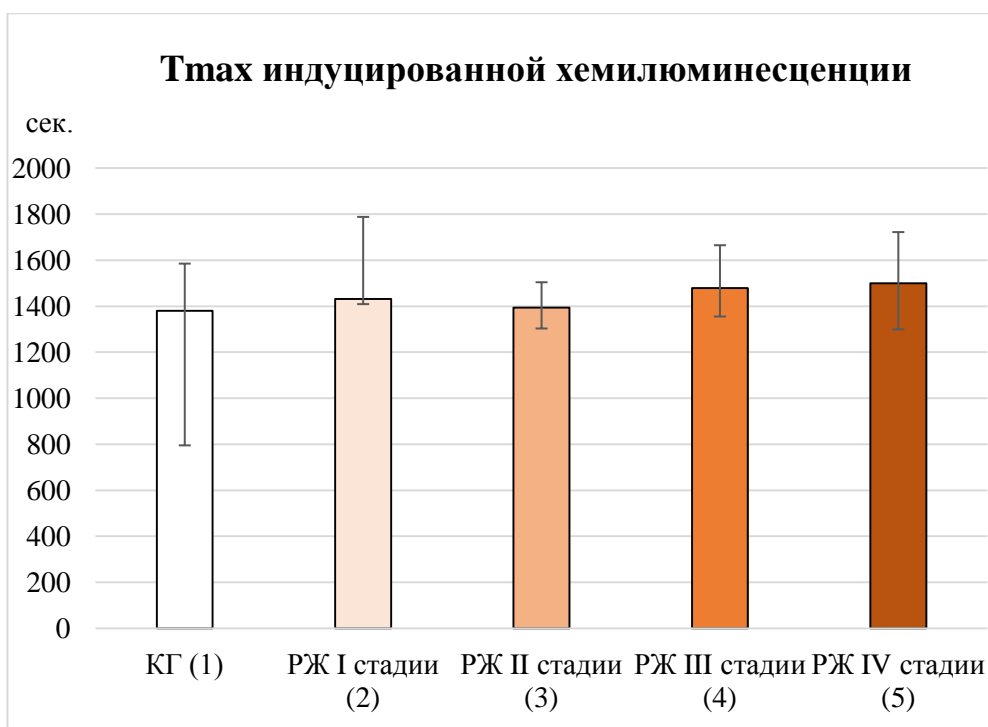


Рисунок 5 – Показатель времени выхода кривой на максимум интенсивности индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка относительно контроля.

Были зафиксированы статистически значимые различия относительно показателей площади под кривой индуцированной хемилюминесценции у больных раком желудка I, II, III и IV стадий по отношению к контрольной группе. При сравнении медианных значений данных показателей групп больных раком желудка к контрольной группе, отмечалось повышение в 11,3, 15, 23,3 и 24,3 раза соответственно.

У больных раком желудка IV стадии отмечалось статистически значимое увеличение показателя при сравнении с больными раком желудка I стадии. При сравнении медианных значений данных показателей было установлено повышение в 2,2 раза. Между группами больных раком желудка статистически значимых различий не было зафиксировано (рис. 6).

Данное повышение уровня площади под кривой индуцированной хемилюминесценции при патологии на всех стадиях по сравнению с контролем, свидетельствует о усиленном ответе нейтрофильных гранулоцитов на антиген, отражающийся в увеличении общего пула продуцируемых активных форм

кислорода. Выявленное статистически значимое повышение показателя группы больных раком желудка IV стадии по отношению к группе больных раком желудка I стадии, свидетельствует о увеличении данного пула в соответствии с прогрессированием рака желудка.

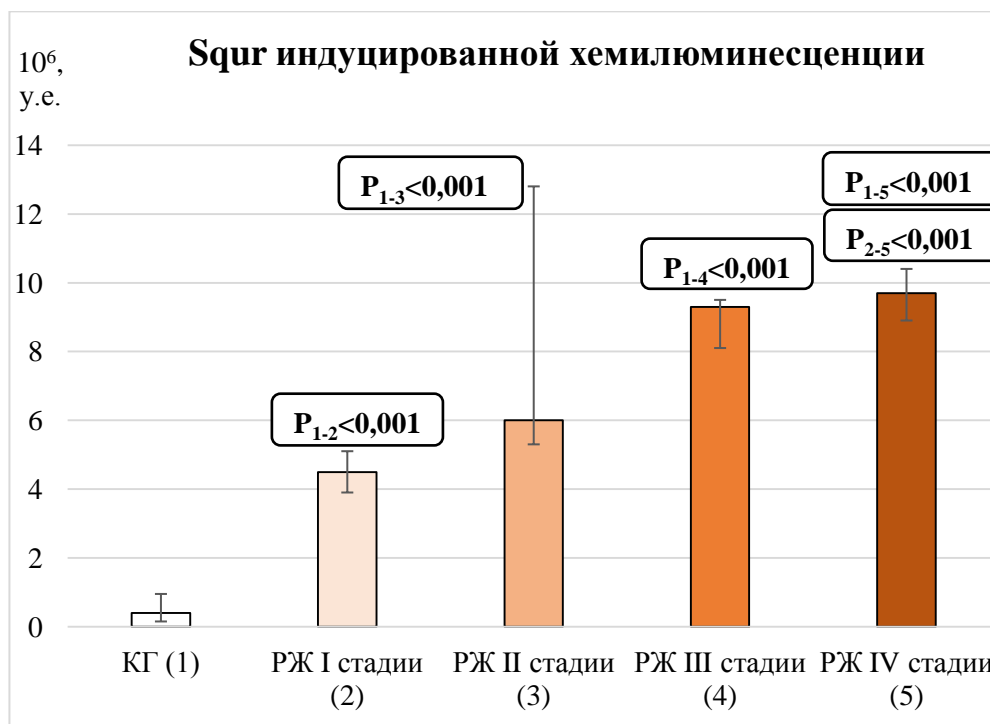


Рисунок 6 – Показатель площади под кривой индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка относительно контроля.

При анализе индекса активации было установлено статистически значимое повышение данного показателя относительно всех групп сравнения больных раком желудка на различных стадиях к контрольной группе. Статистический анализ показателей групп больных раком желудка между собой значимых различий не выявил (рис. 7). Данное явление свидетельствует о повышении способности нейтрофильных гранулоцитов к усиленному синтезу активных форм кислорода при индукции для реализации респираторного взрыва в случае патологии.

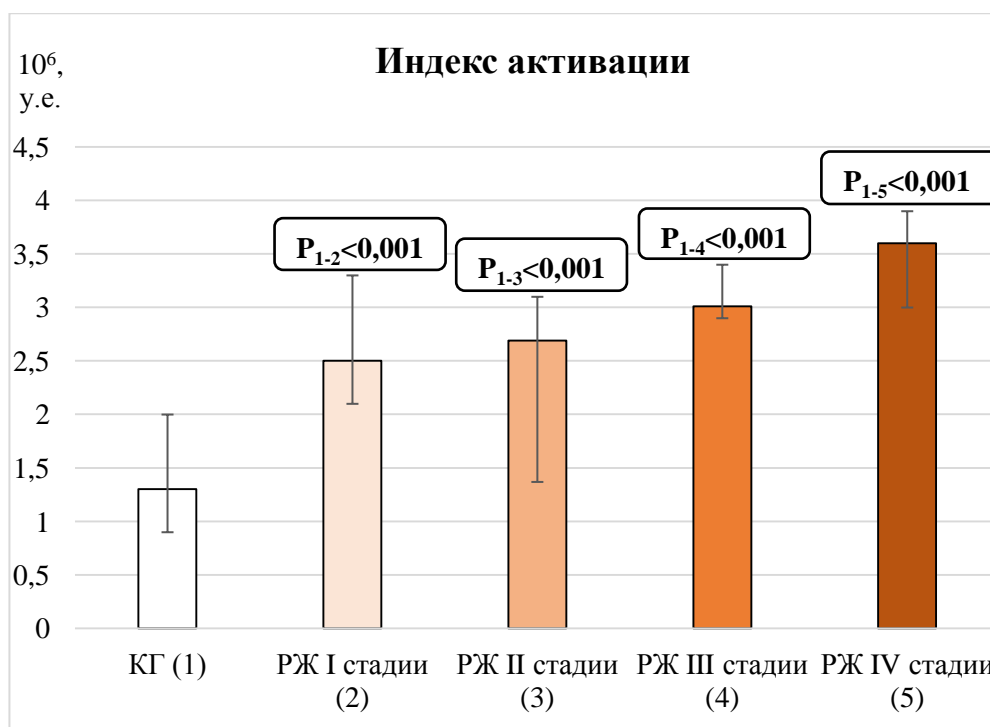


Рисунок 7 – Показатель индекса активации нейтрофильных гранулоцитов у больных раком желудка относительно контроля.

Таким образом, установлено, что при спонтанной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с I-III стадиях рака по сравнению с контролем происходит повышение таких показателей как: время выхода кривой на максимум интенсивности и площадь под кривой. Однако на IV стадии происходит повышения в этих показателях. Также на последней стадии рака желудка наблюдается понижение медианы максимального значения интенсивности спонтанной хемилюминесценции по сравнению со значением группы условно здоровых доноров.

При индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов повышается показатель площади под кривой на всех стадиях заболевания. Однако, на I стадии показатель был ниже, чем на IV стадии рака желудка. Также было зафиксировано увеличение показателя индекс активации нейтрофилов на всех стадиях заболевания.

## **Заключение**

Установлено, что нейтрофильные гранулоциты способны оказывать как противоопухолевое, так и проопухолевое воздействие на раковые клетки в зависимости от стадии заболевания. В ходе настоящего исследования было выявлено следующее:

1. При спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов наблюдалось статистически значимое снижение показателя максимума интенсивности, увеличение времени выхода кривой на максимум интенсивности и площади под кривой хемилюминесценции относительно всех стадий заболевания. Максимальные значения данных параметров проявлялись у больных раком желудка на IV стадии;

2. При индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов статистически значимые различия были выявлены среди показателей площади под кривой хемилюминесценции всех стадий развития рака желудка, с закономерным увеличением данного показателя при прогрессировании заболевания. Наблюдалось увеличение показателей индекса активации среди всех стадий развития рака желудка. Максимальные значения данных показателей выявлялись на IV стадии рака желудка;

3. Корреляционный анализ продемонстрировал снижение показателя максимального значения спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при прогрессировании рака желудка. Выявлено прямо пропорциональное увеличение показателя площади под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции и индекса активации с прогрессированием рака желудка.

## Список использованной литературы

- 1) d Gastroenterologiczny - 2019.- Vol.14, № 1. – PP. 26-38;
- 2) Bray F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians - 2018. –Vol. 68, №6. – PP. 394-424;
- 3) Ferlay J. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods / J. Ferlay [et al.] // International Journal of Cancer – 2019. – Vol. 144, № 8. – PP. 1941-1953;
- 4) Johnston F.M. Updates on Management of Gastric Cancer. / F. M. Johnston, M. Beckman // Current Oncology Reports –2019 –Vol. 21, №8.–PP.1-9;
- 5) Pernot S. Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. / S. Pernot [et al.] // Gastric Cancer – 2019. – Vol. 1, № 1 – PP. 1-9;
- 6) Zhai J. Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer. / J. Zhai [et al.] // Cancer Letters. – 2019.– Vol. 454, №7– PP. 37-43;
- 7) Smith J. P. Gastrin and Gastric Cancer / J. P. Smith [et.al.] // Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. – 2017. – Vol. 4, № 1. – PP. 75 – 83;
- 8) Горбунова Е.А. Соматометрические и индексные показатели в оценке физического статуса больных раком желудка. / Е. А. Горбунова, Н. Н. Медведева, Г. Н. Филькин // *Acta Biomedica Scientifica* – 2018. – Т. 3, № 6 - С. 77-81;
- 9) Хомяков В. М. Современные представления о факторах риска развития рака желудка. / В. М. Хомяков, А. Д. Ермошина, С. С. Пирогов, А. Б. Рябов// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии – 2017. – Т. 27, № 6 – С. 78-86;

- 10) Горошинская И.А. Состояние окислительного метаболизма в крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли [Электронный ресурс]: научная статья / И.А. Горошинская [и др.] // Современные проблемы науки и образования – 2019. Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28440>;
- 11) Мозеров С.А. Гистологическая и молекулярно-генетическая оценка ответа опухоли на химио-/лучевую терапию при раке желудка. [Электронный ресурс]: научная статья / С.А. Мозеров [и др.] // Современные проблемы науки и образования – 2017. Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26684>;
- 12) Земляной В.П. Диагностика и лечение рака желудка осложненного кровотечением. / В.П. Земляной [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 15-20;
- 13) Агранович И. М. Фотодинамическая диагностика рака желудка. / И. М. Агранович [и др.]// Известия Саратовского университета. Серия «Химия. Биология. Экология». - 2019. – Т.19, № 1- С. 50-57;
- 14) Лисяный Н. И. Нейтрофилы и онкогенез/ Н.И. Лисяный, А.А. Лисяный// Клиническая онкология. – 2018. – Т.8, №1 – С. 40-45;
- 15) Савченко А.А. Особенности взаимосвязи фенотипа и хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком почки / А.А. Савченко [и др.] // Медицинская иммунология. - 2016. - Т. 18, № 3. - С. 259-268;
- 16) Бесова Н. С. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком желудка / Н. С. Бесова [и др.] // Общероссийский союз общественных объединений ассоциация онкологов России. – 2014. – С.1-22;
- 17) Бесова Н. С. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака желудка / Н. С. Бесова [и др.] // Злокачественные опухоли – 2018. – Т. 8, №3. – С. 273-288;

- 18) Kinoshita H. Metaplasia in the Stomach—Precursor of Gastric Cancer?// H. Kinoshita, Y. Hayakawa, K. Koike// International Journal of Molecular Sciences – 2017. – Vol. 18, № 10- PP. 1-16;
- 19) Jencks D.S. Overview of Current Concepts in Gastric Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer / D.S. Jencks [et al.] // Gastroenterology & Hepatology – 2018. – Vol.14, №2. – PP. 92-101
- 20) Белковец А.В. Биомаркеры желудочной атрофии у пациентов с раком желудка/А.В. Белковец [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2018. – Т. 28, № 2. – С. 24-32;
- 21) Mukaisho K. Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: interactions among pH, Helicobacter pylori, and bile acid / Mukaisho Ken-ichi, Nakayama T., Hagiwara T.i, Hattori T., Sugihara H. // Frontiers in Microbiology. – 2015. – Vol. 6 - PP. 412
- 22) Moss S.F. The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer / S.F. Moss // Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. – 2017. – Vol. 3, №2. – PP. 183-191;
- 23) Li W.Y. Smoking status and subsequent gastric cancer risk in men compared with women: a meta-analysis of prospective observational studies / W.Y. Li [et al.] // BMC Cancer – 2019. – Vol. 19, № 1. – P.P. 1-12
- 24) Тарасенко Л.А. Хронический Helicobacter pylori ассоциированный гастрит и его роль/ Л. А. Тарасенко [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии – 2015. - Т.14, №1. – С. 80-86;
- 25) Ивашкин, В.Т. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции Helicobacter pylori у взрослых/ В.Т. Ивашкин [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2018. – Т. 28, № 1. – С. 55-70;
- 26) Москалёв А.В. Иммунопатогенез хронического гастрита и его роль в канцерогенезе/ А.В. Москалёв, А.С. Рудой, В.Я. Апчел, А.Ф. Никитин//



Вестник российской военно-медицинской академии. – 2016. – Т.53, №1. – С. 241-247;

27) Giroux V. Metaplasia: Tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer / V. Giroux and A. Rustgi // Nature reviews. Cancer. – 2017. - Vol. 17, №10. - PP. 594–604;

28) Михалёва Л.М. Предраковые поражения и ранний рак желудка: современные клиничко-морфологические данные/ Л.М. Михалёва, А.Е. Бирюков, Н.И. Поляно // Клиническая медицина. - 2017.-Т.95, №10.- С. 881-887.

29) Филиппов Ю.А., Тютюнник В.М. Диагностика, лечение и предупреждение рака желудка с переходом на пищевод // Sciences of Europe. - 2017. – Т.16, №16 - Стр. 34-38;

30) Филиппов Ю. А., Тютюнник В. М. Рак желудка с переходом на пищевод. Диагностика, лечение и предупреждение специальными методами // Перспективы медицины. - 2014. - №1. – С.86-90;

31) Турсынбаев С.Б., Арыбжанов Д.Т. Стадирование рака желудка с использованием диагностической лапароскопии// Наука и инновации – современные концепции. – 2019. – Т. 2 - С. 108-111;

32) Ахметзянов Ф. Ш., Ахметзянова Ф. Ф. Принципы хирургического лечения местно-распространенного рака желудка// Поволжский онкологический вестник. – 2015. – №. 2. - С. 26-45;

33) Барышев А.Г. Оценка функциональной эффективности различных способов восстановления пищеварительной системы после гастрэктомии/ А.Г. Барышев, Н.В. Хачатурьян, Д.А. Валякис, А.О. Лысенко, Ю.С. Калинин, М.В. Бодн // Инновационная медицина Кубани. - 2016. - №3 – С. 27-32;

34) Харитонов М. Ю., Борбашев Т. Т., Тойгонбеков А. К. Местно-распространенный рак желудка (Обзор литературы) //Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. – 2016. – Т. 16., №. 11. – С. 154-157.

- 35) Бондарь В. Г., Гасми Мохамед Мехди. Обзор возможностей химиотерапии рака желудка// Вестник украинской медицинской стоматологической академии. - 2017. – Т. 58, №2 – С. 92-95;).
- 36) Кисличко А.Г. Адьювантная терапия рака желудка/ А.Г. Кисличко, О.В. Хаванева, М.С. Рамазанова, М.Ю. Попов// Вятский медицинский вестник. – 2016. – Т.50, № 2 – С. 10-18;
- 37) Брацун Д.А. Моделирование возникновения и роста раковых образований при коллективном взаимодействии клеток живой ткани, обменивающиеся химическими и механическими сигналами / Д.А. Брацун [и др.]// Вестник Пермского научного центра – 2017. - Т. 33, №1 – С. 20-26
- 40) Андрюков Б.Г. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов 2017. / Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, Е.И. Дробот, Е.В. Матосова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – Т. 68, №1. – С. 4-18;
- 41) Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond / A. Mocsai // Experimental Medicine - 2013. - Vol. 210, №7. - PP. 1283-1290;
- 42) Куртасова Л.М. Особенности хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у онкоурологических больных в динамике заболевания/ Л.М. Куртасова, Р.А. Зуков, Э.В. Семенов// Медицинская иммунология. - 2016. - Т. 18, № 6. - С. 589-594;
- 43) Смирнова О. В. Особенности неспецифического звена иммунитета в прогрессировании рака прямой кишки/ О.В. Смирнова [и др.]// Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология – 2018. - Т.153, № 5. – С. 73–77;
- 44) Данилова А.Б. Нейтрофилы как компонент опухолевого микроокружения/ А.Б. Данилова, И.А. Балдуева // Вопросы онкологии - 2016. – Т. 62, №1. – С. 35-44;
- 45) Jose A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer/ A. Jose, M. Jose, A. Hidalgo// Immunity. - 2017. –Vol. 46, №1 - PP. 15-28;

46) Нестерова И.В. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле/ И.В. Нестерова [и др.]// Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 4. – С. 257-264

47) Нестерова И. В. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1/ И. В. Нестерова [и др.] // Инфекция и иммунитет. - 2017. - Т. 7, № 3. - С. 219-230.

50) Догадин С. А. Активность респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов крови в дебюте болезни Грейвса/ С. А. Догадин [и др.]// Проблемы эндокринологии. – 2017. –Т.63, №1. – С. 4-8;

51) Проскурнина, Е. В. Методы оценки свободнорадикального гомеостаза крови: дис. на соискание ученой степени д-ра мед. наук : 03.01.04/ Проскурнина Елена Васильевна. – Москва, 2018. - 221 с.

52) Владимиров Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция/ Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина// Успехи биологической химии. - 2009. - Т. 49. - С. 341-388.

53) Swierczak A. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis/ A. Swierczak [et al.] // Cancer Metastasis Rev. - 2015. - Vol. 34, №4. - PP. 735-751;

54) Савченко А. А. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода / А. А. Савченко [и др.] // Инфекция и иммунитет. - 2017. - Т. 7, № 1. - С. 51-60.




Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е.И. Шишацкая

подпись    инициалы, фамилия

«25» июня 2021г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

«Показатели хемилюминесцентной активности нейтрофильных  
гранулоцитов при раке желудка в зависимости от стадии»

Руководитель

  
подпись, дата

профессор, д.м.н.  
должность, ученая степень

О.В. Смирнова  
инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

С.В. Шелехина  
инициалы, фамилия

Красноярск 2021